

闪式提取法提取落叶松树皮中原花青素的研究

吕秀亭, 葛 鸽, 呼 娜, 张乔会, 李 琳, 王丰俊, 王建中*

(北京林业大学生物科学与技术学院, 北京林业大学林业食品加工与安全北京市重点实验室, 北京 100083)

摘要: 利用闪式提取法提取落叶松树皮中的原花青素。研究了乙醇体积分数、料液比、提取时间和提取温度对落叶松树皮中原花青素提取率的影响。在单因素实验的基础上, 运用正交实验对结果进行优化。结果表明, 闪式提取法提取落叶松树皮中原花青素的优化条件为: 乙醇体积分数为 60%, 料液比 1:25 (g/mL), 提取时间为 4min, 提取温度 40℃。在此条件下进行验证实验, 原花青素得率达 11.42%。该方法操作简单、速度快、得率高, 适用于落叶松树皮中原花青素的提取。

关键词: 落叶松树皮, 原花青素, 闪式提取法, 正交实验

Study on extraction of proanthocyanidins from Larch Bark by flash extraction

LV Xiu-ting, GE Ge, HU Na, ZHANG Qiao-hui, LI Lin, WANG Feng-jun, WANG Jian-zhong*

(Beijing Key Laboratory of Forest Food Processing and Safety, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: The flash extraction method was employed to extract proanthocyanidins from Larch Bark. The effect of different ethanol volume fraction, raw material to liquid ratio, extraction time, extraction temperature on the extract rate of proanthocyanidins were investigated. The orthogonal experiment was conducted on the basic of the single factor experiment. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: volume fraction of ethanol of 60%, raw material to liquid ratio of 1:25 (g/mL), extraction time of 4min, extraction temperature of 40℃. Under such conditions, the yield of proanthocyanidins was 11.42%. The proposed method was simple and fast with high extraction efficiency, which could be applied to extracting proanthocyanidins from Larch Bark.

Key words: Larch Bark; proanthocyanidins; flash extraction; orthogonal experiment

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)09-0199-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.09.035

落叶松 (*Larix gmelinii*) 为松科落叶松属的落叶乔木, 是我国东北、内蒙古大兴安岭林区的主要森林组成树种, 其面积约占大兴安岭林地面积的 70%。落叶松树皮为我国林业的重要副产物, 其资源丰富, 价格低廉, 易于采收和保藏。落叶松树皮中含有大量的原花青素类化合物, 是很有利用价值的天然产物^[1-3]。原花青素是一种有着特殊分子结构的生物类黄酮, 以儿茶素、表儿茶素及其取代物作为结构单元, 一般为红棕色粉末, 气微、味涩, 溶于水和大多有机溶剂。原花青素具有多种生物活性, 能够清除人体内过剩自由基, 并具有较强的抗氧化能力, 可作为防癌、抗突变和防治心血管疾病药物的主要有效成分。在食品、保健品、化妆品及医药等领域具有广泛

的应用前景^[4-6]。国内外对于落叶松树皮原花青素提取的研究大多都停留在实验室阶段, 如东北林业大学贾佳的匀浆提取法^[4], 孙晓薇的微波辅助提取法^[14], 现在比较成熟投入工厂化生产的有浸渍法、回流提取法^[7-8]。

前人对落叶松原花青素的提取方法主要有浸渍法^[7]、回流提取法^[8]和超声波法^[9]等。这些方法提取时间长、效率太低且操作烦琐。闪式提取法是一种依靠高速机械剪切力和超动分子渗滤技术, 在溶剂存在下破碎物料至细微颗粒, 并迅速提取其有效成分的方法。该方法具有快速高效、适用广泛、操作方便、节能降耗等优点, 能极显著地降低提取的成本^[10-14]。本文以原花青素得率为指标, 运用闪式提取法提取落叶松树皮中的原花青素, 并对单因素处理结果进行了正交实验优化, 旨在为落叶松树皮中原花青素的大规模生产提供有价值的工艺参数。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

收稿日期: 2013-09-22 * 通讯联系人

作者简介: 吕秀亭 (1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物提取。

基金项目: 林业公益行业科研“山杏利用产业链技术体系研发”专项资金 (201004081)。

落叶松树皮 内蒙古金河森林工业有限责任公司;无水乙醇、无水甲醇、浓盐酸、香草醛等 均为分析纯;对照品儿茶素(纯度 98.0%) 美国 Sigma 公司。

JHBE-50S 闪式提取控制器 郑州金星科技有限公司;721 型紫外可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;FA10004A 电子天平 精天精密仪器厂;R-201 旋转蒸发器 上海申顺生物科技有限公司;D-37520 型高速冷冻离心机 Osterode Kendro Laboratory。

1.2 实验方法

1.2.1 处理方法 先横切树皮,片厚 2~3cm,再粉碎并过 18 目筛。精确称量 12g 树皮粉,置于 1000mL 平底烧瓶中,加入 100mL 对应浓度的乙醇浸泡 32h,(为了确定合适的预浸时间,在 1:20 料液比,60% 乙醇体积分数,25℃ 条件下进行实验,确定预浸时间 32h)然后按照一定的料液比加入对应浓度的乙醇溶液,在一定条件下进行闪式提取,以 4000r/min 转速离心 10min,取上清液,进行真空抽滤,对滤液进行减压浓缩,回收乙醇之后,将浓缩膏用甲醇溶解,再稀释至一定浓度进行显色反应测定得率。将浓缩膏置于 45℃ 真空干燥箱内干燥 24~48h,可得到原花青素粗品粉末。

1.2.2 原花青素定量测定 显色反应选用香草醛-盐酸法:3mL 浓度为 40mg/mL 香草醛甲醇液与 1.5mL 浓盐酸及 1mL 无水甲醇溶解待测样品,加塞摇匀,避光。在 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温水浴中保持 15min,保温比色。空白对照用 1mL 甲醇代替样品溶液。反应后取约 3mL 各样品于比色皿中,以空白调基线,于 500nm 处测定吸光度^[15]。

1.2.3 标准曲线的绘制 精密称取儿茶素对照品 10mg,甲醇溶解并定容于 50mL 容量瓶中,为对照品储备液。分别取 1.0,2.0,4.0,6.0,8.0 和 10mL 储备液,然后用甲醇定容至 10mL。各取 1mL 以上溶液进行显色反应,每个浓度重复 3 次,按以上方法检测吸光度,绘制标准曲线,计算回归方程。

1.2.4 得率计算 按以下公式计算提取得率:

$$P(\%) = m/W \times 100$$

式中:P-得率;m-提取液中原花青素的质量(mg);W-落叶松树皮粉的质量(mg)。

1.2.5 单因素实验

1.2.5.1 乙醇的体积分数对得率的影响 为了探究在闪式提取中所用溶剂的体积分数对提取得率的影响,分别设定乙醇体积分数为 40%、50%、60%、70%、80%,1:25 的料液比,闪提温度 40℃,闪提时间 2min,确定最佳乙醇体积分数。

1.2.5.2 料液比对得率的影响 为了探究在闪式提取中料液比对提取得率的影响,分别设定料液比为 1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 (g/mL),乙醇体积分数为 50%,闪提温度 40℃,闪提时间 2min,确定最佳的料液比。

1.2.5.3 提取时间对得率的影响 为了探究闪提时间对提取得率的影响,分别设定闪提时间为 1、2、3、

4、5min,乙醇体积分数 50%,1:25 的料液比,闪提温度 40℃,确定最佳闪提时间。

1.2.5.4 提取温度对得率的影响 为了探究闪提温度对提取得率的影响,闪提温度分别设定为 30、40、50、60、70℃,乙醇体积分数 50%,1:25 的料液比,闪提时间 2min,确定最佳提取温度。

1.2.6 正交实验设计 选取乙醇体积分数、料液比、提取时间和提取温度组成复合提取条件,每个因素设置三个水平,采用 $L_9(3^4)$ 进行正交实验(如表 1),得出优化的提取条件。

表 1 正交实验因素水平设计表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

水平	因素			
	A 提取时间 (min)	B 料液比 (g/mL)	C 提取温度 (°C)	D 乙醇体积分数 (%)
1	3	1:20	30	40
2	4	1:25	40	50
3	5	1:30	50	60

1.3 数据分析

采用 Microsoft Excel (Office 2007) 软件整理数据,SPSS 17.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 儿茶素标准曲线

如图 1 所示,为儿茶素标准曲线。

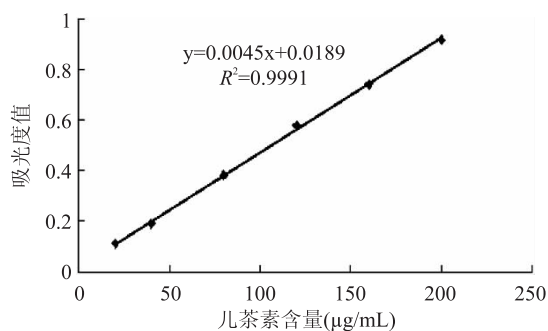


图 1 儿茶素标准曲线

Fig.1 Catechin standard curve

2.2 前处理树皮粉预浸时间确定

树皮原花青素得率随时间的变化如图 2 所示。

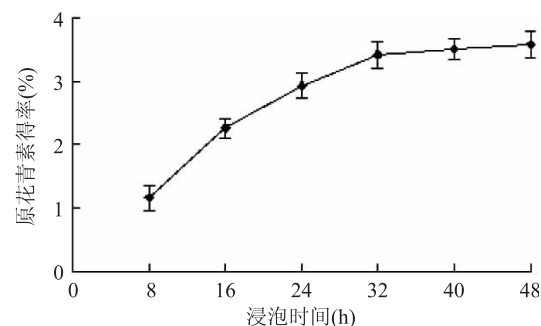


图 2 前处理浸泡时间对原花青素得率的影响

Fig.2 Effects of soak time on yield of Proanthocyanidins

从图 2 可以看出,随着浸泡时间的增加,溶液中

原花青素含量逐步上升,在 32h 之后增长变得缓慢,随着时间的增加,树皮粉末逐渐被浸湿与溶液接触面积增大,树皮中的原花青素逐渐溶于溶液中,在 32h 后接近充分溶解,此后再增大需要借助闪提。从节约前处理时间和得到较高的原花青素得率方面考虑,落叶松树皮粉前处理浸泡时间选定为 32h。

2.3 落叶松树皮原花青素提取单因素实验结果

2.3.1 不同乙醇体积分数对原花青素得率影响 从图 3 看出,在 50% 乙醇体积分数时,原花青素提取得率达到最大值,此后随着乙醇体积分数的增加原花青素得率逐渐下降,可能是因为 50% 乙醇提取剂的极性能保证对原花青素有最好的溶解度,偏离最佳溶解度时提取得率会有所下降。因此确定乙醇体积分数最佳为 50%。

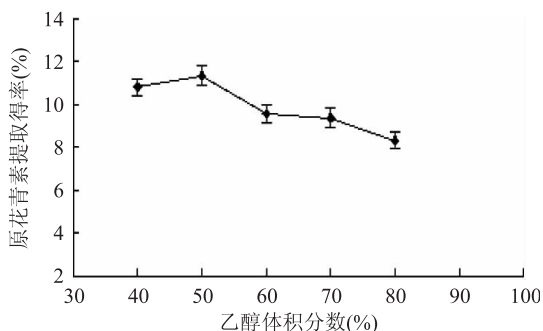


图3 乙醇体积分数对原花青素提取得率的影响

Fig.3 Effects of ethanol volume fraction on yield of Proanthocyanidins

2.3.2 不同料液比对原花青素得率的影响 从图 4 看出,在料液比从 1:15 增加到 1:25 时,原花青素提取得率稳步上升,可能是因为随着料液比增大,目的提取物会更易溶于提取溶剂中,但随着料液比达到 1:25 后,提取得率增加会变缓甚至有所下降,可能是因为一定比例的溶剂已经将有效成分溶出完全,再加大料液比会使杂质多溶出,从而影响原花青素的溶出,造成提取得率下降。因此选择 1:25 作为最佳料液比。

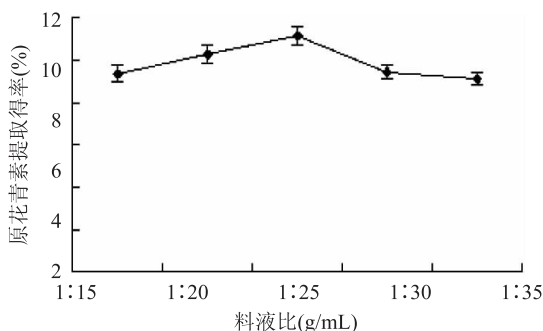


图4 料液比对原花青素提取得率的影响

Fig.4 Effects of ratio of raw material to liquid on yield of Proanthocyanidins

2.3.3 不同提取时间对原花青素得率的影响 从图 5 可以看出,随着提取时间的增加,原花青素的提取得率逐渐增大,在提取时间为 4min 时达到最大值,此后再增加提取时间,原花青素的提取得率反而会下降。可能是因为随着闪提时间的延长,机械剪切

力作用产生大量的新生表面,加速了原花青素的溶解与扩散,提取得率逐渐升高。时间大于 4min 时,已经超过提取平衡点,闪提器的转头产热过多,原花青素对热比较敏感,造成提取得率下降。因此确定最佳提取时间为 4min。

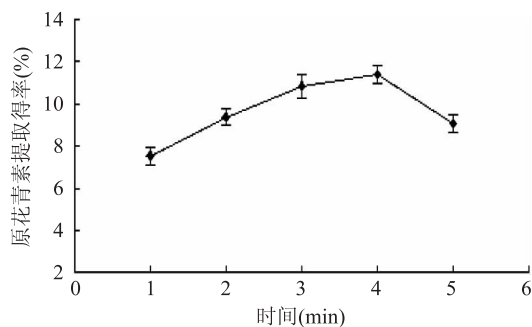


图5 提取时间对原花青素提取得率的影响

Fig.5 Effects of extraction time on yield of Proanthocyanidins

2.3.4 不同提取温度对原花青素得率的影响 从图 6 可以看出,温度的高低对原花青素的提取有较大的影响。随着温度的升高,原花青素提取得率增大,当温度达到 40℃ 时提取得率达到最大,之后明显下降。可能是原花青素对热比较敏感,较高的温度会破坏其结构,导致原花青素提取得率下降,所以确定最佳提取温度为 40℃。

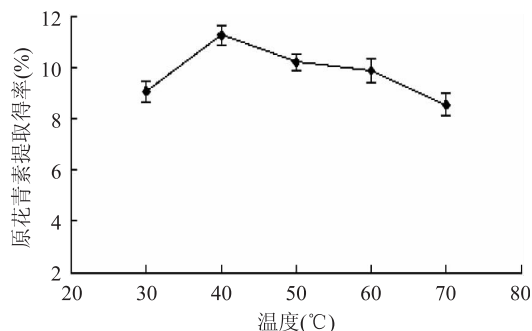


图6 温度对原花青素提取得率的影响

Fig.6 Effects of extraction temperature on yield of Proanthocyanidins

2.4 最佳提取工艺条件的确定

由表 2 可以看出,4 个因素对落叶松树皮中原花青素提取得率影响大小依次为:乙醇体积分数(D) > 提取时间(A) > 温度(C) > 料液比(B)。落叶松树皮中原花青素的优化提取工艺为 A₂B₂C₂D₃,即乙醇体积分数 60%,料液比 1:25 (g/mL),提取时间 4min,提取温度 40℃。

2.5 闪式辅助提取落叶松树皮中原花青素的验证实验

按照选定的条件 A₂B₂C₂D₃ 重复实验 3 次,得率分别为 11.64%、11.36%、11.26%,平均值为 11.42%,均高于表 2 中其他组合的原花青素得率,说明优化的提取工艺是合理的。

3 结论

落叶松树皮原花青素提取的优化工艺参数组合

为:乙醇体积分数为 60%,料液比 1:25 (g/mL),提取时间为 4min,提取温度 40℃;在此条件下,原花青素提取得率达到 11.42%。闪式提取法相对于浸渍法、回流提取法、超声波法、匀浆法具有快速高效且对提取物质活性影响较小的优点,同时也是在以往研究工作基础上的创新,为产业化提取落叶松树皮中的原花青素提供了有效的技术参考。

表 2 正交实验结果分析

Table 2 Results of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	原花青素提取得率 (%)
1	1	1	1	1	6.84
2	1	2	2	2	8.67
3	1	3	3	3	9.13
4	2	1	2	3	10.84
5	2	2	3	1	8.09
6	2	3	1	2	9.89
7	3	1	3	2	7.05
8	3	2	1	3	10.67
9	3	3	2	1	8.23
k ₁	8.213	8.243	9.133	7.720	
k ₂	9.607	9.143	9.247	8.537	
k ₃	8.650	9.083	8.090	10.213	
R	1.394	0.900	1.157	2.493	

参考文献

- [1] 王建和. 国内外对树皮的利用和研究[J]. 广东林业科技, 1990(1): 17-18.
 [2] Hammerstone J F, Lazarus H H. Procyanidin content and

(上接第 198 页)

冰温真空干燥过程中保持在冰温带内。实验表明, 仅仅将真空箱维持在某个真空度下, 鱼肉是无法维持冰温的; 同时调节真空箱真空度和电加热板温度可以使鱼肉在几小时内处于冰温带内, 但之后温度会缓慢上升; 若真空箱真空度、电加热板温度和冷库温度协同控制可以使鱼肉很好的保持在冰温带内, 直到鱼片干燥结束。在不同干燥工艺的对比中, 冰温真空干燥青鱼片的鲜度指标 K 值明显优于热风干燥, 接近冷冻干燥, 复水率比热风干燥稍好, 干燥速率比热风干燥稍慢, 比冷冻干燥快。

参考文献

- [1] 申保庆, 赵祥涛, 何翔. 低温真空干燥技术与设备的发展前景与适用范围[J]. 粮食流通技术, 2004, 32(4): 42.
 [2] 高福成. 现代食品工业高新技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.
 [3] 李林, 申江, 王晓东. 冰温贮藏技术研究[J]. 保鲜与加工, 2008, 45(2): 38-41.
 [4] 王丰, 李保国, 申江, 等. 胡萝卜冰温干燥实验研究[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(1): 101-104.
 [5] 山根昭美, 郭海元. 制冷[M]. 东京: 株式会社冰温研究所东京事务所, 1987: 64-67.

- variation in some commonly consumed food[J]. J Nutr, 2000, 138(8): 2086-2092.
 [3] 徐璐, 郑建仙. 松树皮提取物的研究进展[J]. 食品工业, 2005(4): 36-38.
 [4] 贾佳, 杨磊, 祖元刚. 落叶松树皮原花青素的匀浆提取及响应面法优化[J]. 林产化学与工业, 2009, 29(3): 78-80.
 [5] 李宛花. 葡萄子原花青素对糖尿病大鼠肾保护机制的分子生物学研究[D]. 济南: 山东大学, 2008.
 [6] Singletary K W, Melin B. Effect of grape seed proanthocyanidin on colon aberrant crypts and breast tumora in a rat dual-organ tumor model[J]. Nature and Cancer, 2001, 29(2): 252-256.
 [7] 陈磊, 王军. 山葡萄籽中原花青素的提取[J]. 中国野生植物资源, 2008, 27(1): 58-60.
 [8] 杨磊, 苏文强, 李艳杰, 等. 正交实验法优选低聚原花青素的提取工艺[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(2): 57-60.
 [9] 葛亮, 张志强, 杨清香. 葡萄籽中原花青素提取工艺的研究[J]. 农产品加工: 学刊, 2008, 7(4): 55-59.
 [10] 刘灿, 荣永海, 王志滨, 等. 闪式提取法提取罗汉果多酚[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 50-51.
 [11] 张迪, 王勇, 王彦兵, 等. 闪式提取法提取枣果皮中多酚的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(4): 259-260.
 [12] 孟庆举, 易红, 杨华, 等. 闪式提取法用于紫草的工艺条件研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14): 2302-2303.
 [13] 朱兴一, 顾艳芝, 谢捷, 等. 闪式提取红茶中茶黄素的工艺研究[J]. 食品科技, 2012, 37(8): 189-190.
 [14] 王玥, 杜守颖, 吴清, 等. 川芎中阿魏酸的闪式提取工艺研究[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(8): 559-560.
 [15] 孙晓薇, 李丽丽, 王涵, 等. 微波辅助提取落叶松树皮原花青素及其条件优化[J]. 食品工业, 2012(1): 35-36.
 [6] 金听祥, 李改莲, 张全国, 等. 不同蔬菜真空冷却过程影响因素分析[J]. 河南农业大学学报, 2005, 39(1): 71-74.
 [7] JIANG Qi-bin, M Houska, J Setak. Vacuum Cooling of Foods[J]. Journal of Sichuan University of Science and Technology, 2001, 20(3): 36-39.
 [8] 陈椒, 张青, 徐世琼, 等. 鲜肉真空冷却保鲜工艺的研究[J]. 保鲜与加工, 2001(5): 9-11.
 [9] 金听祥, 朱鸿梅, 李改莲, 等. 真空冷却技术的研究进展[J]. 食品科学, 2005, 26(6): 276-280.
 [10] 闫一野. 普通真空干燥设备综述[J]. 干燥技术与设备, 2011, 9(2): 57-63.
 [11] Yokoyama Y, Sakaguchi M, Fumio Kawai, et al. Change in concentration of ATP-related compounds in various tissues of oyster during ice storage[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1992, 58(11): 2125-2136.
 [12] V An-Erl King, Chia-Fang Liu, Yi-Jing Liu. Chlorophyll stability in spinach dehydrated by freeze-drying and controlled low-temperature vacuum dehydration[J]. Food Research International, 2001(34): 167-175.
 [13] V A-E King, J-F Chen. Oxidation of Controlled Low-temperature Vacuum Dehydrated and Freeze-dried Beef and Pork[J]. Meat Science, 1998(48): 11-19.